LABORAT. DI ISTOLOGIA E FISIOLOGIA GENER DELLA R. UNIVERS. DI ROMA
DIRETTO DAL PROF. G. MAGINI

DOTT. SAMUELE SERENI

CONTRIBUTO
ALLO
STUDIO DELLE METACROMASIE

Estratto dal Bollettino della R. Accademia Medica di Roma

Anno XXX - Fasc. III

ROMA
F. CENTENARI & C.°, TIPOGRAFI
Via degli Avignonesi, 30-31
Telefono 23 12

1904

LABORAT. DI ISTOLOGIA E FISIOLOGIA GENER DELLA R. UNIVERS. DI ROMA
DIRETTO DAL PROF. G. MAGINI

DOTT. SAMUELE SERENI

CONTRIBUTO

ALLO

STUDIO DELLE METACROMASIE

Estratto dal Bollettino della R. Accademia Medica di Roma

Anno XXX - Fasc. III

ROMA
F. CENTENARI & C.°, TIPOGRAFI
Via degli Avignonesi, 30-31
Telefono 23 12

1904

Dott. SAMUELE SERENI. — Contributo allo studio delle metacromasie.

Nell'eseguire alcune ricerche sul pancreas, ho avuto l'opportunità di notare alcuni fenomeni di metacromasia che, per varie ragioni, credo opportuno di far rilevare.

Come è noto, col nome di *metacromasia* e di *colorazione metacromatica,* l' Ehrlich ha voluto indicare quel fenomeno per il quale una sostanza colorante, chimicamente unica, ben definita e pura, colora elementi di tessuti diversi con una tinta diversa da quella della soluzione colorante impiegata: e non soltanto i diversi citoplasmi presentano questo fenomeno, ma anche i diversi elementi morfologici della cellula, cosicchè per esempio, la safranina che, come si sa, è una sostanza colorante rossa di anilina, tinge in rosso i nuclei delle cellule della cartilagine ialina, in rosa pallido il citoplasma di queste stesse cellule, ed in giallo arancio la sostanza intercellulare. Al contrario la colorazione rossa che assume la sostanza amiloide col verde iodio non ha il valore di una vera metacromasia e non si tratta di altro che di una semplice elezione di colore: infatti essa dipende dalla impurità di questa materia colorante, cioè dalla mescolanza con metil violetto, e non si ha quindi più a che fare con un colore unico, con una individualità chimica, che è, come abbiamo detto, la condizione essenziale ed assolutamente necessaria, perchè si possa parlare di metacromasia.

Lo stesso Ehrlich poi ha chiamato *corpi cromotropi* quegli elementi dei tessuti che presentano la proprietà suddetta, ed in seguito tali denominazioni sono state accettate dagli altri

studiosi che si sono occupati di tale argomento, il quale è andato sempre più acquistando maggiore importanza negli studî biologici.

Ed infatti è in base alla metacromasia che l' Hoyer potè dimostrare la mucina nei diversi tessuti, essendo essa colorata metacromaticamente soltanto da alcune sostanze coloranti basiche di anilina (thionina, bleu di toluidina, safranina, ecc.). Ed è per la stessa ragione che l' Henneguy ritiene, quantunque il numero delle sostanze metacromatiche e quello dei corpi cromotropi sia ancora molto limitato, che lo studio proseguito simultaneamente dai chimici, dai fisiologi e dagli istologi, debba rendere i più grandi servigi alla citologia ed alla istologia e che la metacromasia debba, fra qualche tempo, costituire la base dell'analisi microchimica del protoplasma e dei suoi derivati. È naturale quindi che qualunque contributo allo studio di un tale argomento abbia sempre una grande importanza ed è per tale ragione che ho creduto meritevoli di una breve nota le osservazioni da me fatte a questo proposito.

Come ho già accennato, il numero delle sostanze coloranti metacromatiche è limitato, ed oltre lo Iodio che si può considerare come il più antico rappresentante di esse, il Michaelis, che è quegli che più di recente si è occupato di siffatto argomento, distingue i gruppi seguenti:

1° quello delle sostanze coloranti del trifenilmetano, nel quale gruppo sono comprese quelle materie coloranti basiche, che contengono uno o più gruppi amidici metilizzati ed il cui nome varia secondo le fabbriche;

2° quello delle thiazine, che comprende quelle sostanze coloranti basiche, i cui gruppi amidici non sono affatto metilizzati, o lo sono soltanto in modo incompleto. Le principali di tali sostanze sono la thionina ed il bleu di toluidina, mentre il bleu di metilene, che è completamente metilizzato, non è metacromatico;

3° quello delle oxazine, per le quali valgono le stesse regole di quelle del gruppo precedente e quindi l'oxonina è fortemente metacromatica ed altrettanto i diversi Kresylvioletto (R extra, RR), mentre non lo è l'analogo del bleu di metilene, cioè il bleu di Capri.

Gli elementi cromotropi dei tessuti, finora conosciuti sono anche essi, come pure ho già accennato, in numero assai limitato e si riducono principalmente alla sostanza amiloide, alla mucina, alla sostanza fondamentale delle cartilagini, ai granuli delle mastzellen, a quelli di glicogene e a quelli di amido. Danno pure delle metacromasie, ma molto labili ed in modo incostante (e quindi in generale non si fanno rientrare fra le vere metacromasie) anche le guaine midollari delle fibre nervose ed il tessuto connettivo fibrillare che, con le soluzioni acquose di thionina si colorano, le prime leggermente in rosso, l'altro in violetto più intenso che i nuclei; i cilindrassi che con il bleu di toluidina acquistano una colorazione vitale bleu violetta, ecc.

In generale le metacromasie si hanno colorando i tessuti con soluzioni acquose delle sostanze coloranti e soltanto poche (come per esempio quella delle mastzellen) si verificano anche adoprando soluzioni coloranti alcooliche o idro-alcooliche.

Alcune colorazioni metacromatiche sopportano la disidratazione negli alcool e quindi i preparati possono essere montati nel balsamo del Canadà, altre al contrario non sopportano questi passaggi e quindi le sezioni colorate possono essere montate nell'acqua, nella quale la metacromasia dura per un certo tempo, ma meglio ancora nello sciroppo di levulosio che la conserva più nettamente e più a lungo: la glicerina invece è del tutto inadatta a questo scopo, sia perchè estrae abbastanza rapidamente il colore, sia perchè annulla alcune metacromasie, sia ancora perchè penetra lentamente. La cromotropia si può studiare tanto sopra tessuti esaminati a fresco, quanto, ma non sempre, sopra pezzi di organi fissati ed inclusi in paraffina o in celloidina. La fissazione in alcool permette lo studio di alcune metacromasie, purchè il soggiorno in questo liquido non sorpassi un certo tempo (in generale otto giorni), ma la cromotropia si conserva meglio nei pezzi fissati in formolo o meglio ancora in quelli fissati con soluzioni di sublimato corrosivo. In nessun trattato di tecnica microscopica, nè in alcuno dei lavori riguardanti la metacromasia che ho potuto consultare, ho trovato fatto cenno all'influenza che gli altri fissatori esercitano sulla metacromasia dei vari elementi cromotropi dei tessuti, ma per mio

conto posso aggiungere che i liquidi osmici (liquido di Flemming, ecc.) conservano perfettamente tale proprietà, e che in modo analogo si comportano il liquido di Bouin (formolo parti 10, soluzione acquosa satura di acido picrico parti 30, acido acetico glaciale parti 2) e quello di Tellyesniczky (bicromato di potassa grammi 3, acqua distillata grammi 100, acido acetico glaciale cc. 3-5), che sono i fissatori più raccomandati dai libri recentissimi di tecnica microscopica.

Credo inutile riferire qui per esteso le varie ipotesi emesse per spiegare la natura, l'essenza della metacromasia, perchè si tratta di una questione molto intricata e controversa, nella quale l'accordo fra i diversi autori è tutt'altro che completo e che ci porterebbe troppo per le lunghe: mi basta soltanto l'accennare come nessuna delle teorie proposte finora per spiegare il fenomeno è applicabile a tutti i casi e come nessuna di esse vada esente da obbiezioni.

Ed ora che ho così rapidissimamente passato in rivista le notizie principali che si hanno riguardo alla metacromasia, riferirò i risultati delle mie osservazioni.

Fra le numerose e svariate sostanze coloranti delle quali mi sono servito nelle mie ricerche sul pancreas ho adoprato anche il rosso magenta, colore di anilina rosso, basico, appartenente al gruppo della fuxina. Sotto quest'ultimo nome (da non confondersi con quello di fuxina acida o säurefuchsin) (1), e con quelli di rubina, solferino, roseina, eritrobenzina, corallina, rosso di anilina, azaleina, rubianite, harmalino, fucsiacina, si trova in commercio tutta una serie di sostanze coloranti formate dalla miscela di cloridrato, acetato, o più di rado di nitrato o solfato di pararosanilina (anidrite del tri-para-ammido-trifenil-carbinolo) e del corrispondente sale di rosanilina (anidrite del tri-para-ammido-metatolil-difenil-carbinolo), diversamente solubili nell'acqua, a seconda della loro composizione chimica, ma che posseggono tutte un intenso potere colorante. Il rosso magenta, non ostante che

(1) La fuxina acida, chiamata anche säurefuchsin, fuchsin S., rubin S., säurerubin, magenta acida, magenta S., è il sale di sodio della rosanilina disolfoconiugata: è una materia colorante rossa, ma acida di anilina ed è uno dei migliori coloranti plasmatici conosciuti.

sia stata una delle prime sostanze coloranti introdotte nella tecnica microscopica e che sia un buon mezzo colorante nucleare e che renda ottimi servigi per la colorazione dei batteri, pure non ha raggiunto una grande diffusione e viene usato un po' più frequentemente soltanto in Inghilterra. Allo stato solido esso si presenta in forma di cristallini più o meno grossi, di un magnifico verde splendente, mentre le sue soluzioni sono colorate in rosso fucsina. Io ho usato in generale le soluzioni acquose satura o all' $^1/_{100}$, perchè le medesime soluzioni, ma alcooliche, sono molto meno adatte per le colorazioni dei tessuti animali. Secondo il Michaelis, del quale ho riportato sopra la classificazione delle sostanze coloranti che danno metacromasie, e che ha riassunto tutte le nozioni che si avevano su questo argomento, la fuxina e per conseguenza anche il rosso magenta che, come abbiamo visto, va ascritto al gruppo di questa sostanza colorante, tantochè l'una di queste denominazioni viene spesso usata dagli autori come sinonimo dell'altra, non avrebbe potere metacromatico (*dagegen ist das nicht methylirte Rosanilin und Pararosanilin, dessen Salze das Fuchsin darstellen, nicht metacromatisch*). Ora io invece adoprando tale sostanza colorante sopra sezioni di pezzetti di pancreas di animali diversi (rana, tritone, ecc.), fissati in liquido di Flemming, ho ottenuto delle bellissime tinte metacromatiche di alcune parti di elementi cellulari non ancora indicate come cromotrope. E precisamente, mentre i nuclei delle cellule pancreatiche e di quelle degli isolotti di Langerhans, dei condotti escretori, dei corpuscoli bianchi del sangue, ecc., prendono la tinta propria della sostanza colorante, cioè rosso-violacea, rosso-solferino, i nuclei invece delle emazie assumono un colorito rosso-granato vivo, che fa spiccare e mette in evidenza tali elementi cellulari anche là dove essi si trovano isolati (vedi fig. 1). Tale reperto ha per noi una grande importanza, anche perchè ci fornisce una nuova conferma della teoria che ammette la molteplicità delle cromatine nucleari: si tratta infatti in tal caso di una vera e propria reazione microchimica differenziale.

Una tinta diversa da quella della soluzione colorante assume pure nei preparati di pancreas fissati e colorati nel modo già detto, il cosi detto *Nebenkern*.

Questo nuovo organito scoperto dal Lavalette Saint-George nel 1867 nelle cellule seminali e dal Nussbaum nel 1881 in parecchie specie di cellule glandolari e chiamato pure *Nebenkörper* o corpo accessorio, nucleo accessorio, nucleo secondario, paranucleo, corpuscolo paranucleare, si tinge in questi preparati con un colorito rosa-grigiastro che lo fa distinguere prontamente dalle altre parti costituenti la cellula pancreatica. Si ha così un mezzo molto facile e pronto per mettere in evidenza con tutte le particolarità, dettagli, forme e aspetti diversi questo corpuscolo non sempre ben dimostrabile e tuttora enigmatico, poichè sulla sua origine e sul suo destino, sul suo significato e sul suo valore morfologico e fisiologico regna ancora la più completa oscurità. Talora esso è unico, altre volte invece se ne riscontrano parecchi in una stessa cellula, altre volte ancora è del tutto assente : la sua grandezza è variabile ma per lo più esso è più piccolo del nucleo, anche la forma può essere diversa, ma in generale è ovalare ovvero è a semiluna, ed in tal caso trovasi strettamente addossato alla estremità basale del nucleo. L'aspetto è alcune volte omogeneo, mentre in altri casi gli strati più superficiali si presentano come già l'hanno descritto anche Ogata, Eberth e Muller, Platner, in forma di lamelle concentriche. Con notevole frequenza ho riscontrato pure quell'aspetto, già indicato da altri, di un corpuscolo con una cavità contenente uno o più granuli, che nei miei preparati, fissati col liquido di Flemming, erano tinti in nero dall'acido osmico. (Vedi fig. 1).

Questi risultati mi hanno spinto ad estendere maggiormente le mie ricerche ed ho voluto quindi dapprima vedere se anche la fucsina godesse delle stesse proprietà del rosso magenta, ed in seguito saggiare se ambedue queste sostanze coloranti fossero fornite di potere metacromatico anche verso gli altri corpi cromotropi già noti, ed ecco quanto ho ottenuto.

Anche della fucsina ho adoperato per lo più delle soluzioni acquose sature ovvero all' 1 per cento, e soltanto di rado e come controllo, le stesse soluzioni ma alcooliche. Colorando con questi liquidi delle sezioni di pezzi di pancreas di animali diversi, fissati in liquido di Flemming, si hanno le stesse tinte metacromatiche tanto dei nuclei dei corpuscoli rossi, quanto dei nebenkerne delle cellule pàncreatiche.

Ma queste mie ricerche mi hanno portato alla conclusione che anche il rosso magenta e la fucsina, contrariamente all'asserzione sopra riferita del Michaelis, sono dotate di uno spiccatissimo potere metacromatico verso alcuni dei principali corpi cromotropi già conosciuti. E siccome la classificazione del Michaelis è basata sulla composizione chimica delle sostanze coloranti, questi miei risultati vengono ad infirmare la sua teoria e le regole sulle quali essa si fonda. Colorando infatti con una delle suddette sostanze coloranti delle sezioni di intestino di animali diversi e fissati con liquidi differenti, le cellule mucipare si distinguono subito in modo nettissimo perchè la mucina in esse contenuta si tinge in violetto più o meno intenso e scuro secondo la maggiore o minore durata della colorazione e la concentrazione più o meno forte della soluzione colorante, mentre tutti i nuclei dei vari elementi cellulari prendono la tinta rosso violacea della fucsina e del rosso magenta. A questo proposito credo opportuno far notare che anche nelle sezioni di questi organi fissati, come ho detto, con i liquidi fissatori più svariati, i nuclei degli eritrociti si tingono sempre in rosso-granato vivo, conservando cioè quel potere metacromatico che avevo già notato in questi stessi elementi cellulari che si riscontravano nel pancreas fissato in liquido diFlemming.

I passaggi succcssivi negli alcool di diversa concentrazione per decolorare e disidratare le sezioni colorate con i liquidi suddetti, non distruggono la metacromasia nè della mucina, nè dei nuclei delle emazie, cosicchè tali preparati possono essere montati nel balsamo del Canadà. Non avviene altrettanto della colorazione metacromatica che assume con questi colori la sostanza amiloide nelle sezioni di organi affetti da tale degenerazione, poichè essa viene completamente annullata dai passaggi successivi negli alcool. Del resto questo modo di comportarsi non deve meravigliare pèrchè è comune anche alle altre sostanze coloranti di anilina che pure dànno delle tinte metacromatiche delle sostanza amiloide. Ed è appunto al metodo consigliato per queste che occorre ricorrere per conservare la metacromasia data dal rosso magenta e dalla fuxina con la sostanza amiloide.

E cioè, dopo aver colorato le sezioni nella soluzione colo-

rante satura o all'1 % per 5-30 minuti, si trattano con una soluzione acquosa al ½-1-2 % di acido acetico, ricambiando spesso il liquido, fintantochè si hanno delle nuvole di colore: in generale questa procedura non dura più di 2-3 minuti: si fa quindi un lavaggio accuratissimo in acqua distillata, ricambiandola più volte, poichè la durabilità dei preparati dipende appunto dalla maggiore o minore accuratezza con la quale è stato asportato l'acido acetico: si asciuga con carta bibula o da filtro, e si monta in una soluzione satura di acetato di potassa o di levulosio o in sciroppo di zucchero: la glicerina, come al solito, è poco adatta perchè annulla in pochi giorni la metacromasia.

In queste sezioni i nuclei delle cellule normali si presentano tinte in rosso-violaceo, mentre le parti che hanno subìto la degenerazione amiloide spiccano per la loro tinta metacromatica rosa, più o meno intensa secondo la durata diversa della colorazione e la diversa concentrazione della soluzione colorante. (Vedi fig. 2).

Come gli altri metodi basati sulla colorazione metacromatica data da alcuni colori di anilina, anche questo gode del vantaggio di rendere possibile uno studio esatto dei rapporti fra la sostanza amiloide e le singole unità dei tessuti, perchè dà una limitazione netta delle parti affette da degenerazione di fronte a quelle ancora sane. Questa reazione, come le altre impiegate per riconoscere la degenerazione amiloide, si verifica nel modo migliore e più netto sul materiale fresco sezionato col microtomo a congelazione o a mano, cosa del resto non tanto difficile, data la consistenza più dura dei tessuti affetti da tale alterazione. Tuttavia la reazione riesce bene anche sul materiale fissato in liquidi diversi (alcool, formolo, formalina Müller, sublimato, ecc., meno bene in quello fissato in miscele cromiche), indurito e incluso in paraffina o in celloidina. Per quello che riguarda la sostanza fondamentale delle cartilagini ed i granuli delle mastzellen, non mi è mai riuscito nè col materiale fresco, nè con quello fissato con i liquidi più svariati, di ottenere col rosso-magenta o con la fucsina, delle tinte metacromatiche.

BIBLIOGRAFIA

P. Ehrlich - Arch. für mikrosk. Anat. 1877.

H. Hoyer. - *Ueber den Nachweis des Mucins in Geweben mittelst der Färbemethode.* - Archiv. für mikrosk., Anat. 1890. - Bd. XXXVI.

R. Krause. - Arch. für mikrosk. Anat. 1897. - Bd. XLVII.

Henneguy. - *Leçons sur la cell le.* - Paris, 1896.

Michaelis. - Articolo sulla *Metachromasie* nella Encyklopädie der Mikroskopischen Technick di Ehrlich Krause, ecc., 1903.

Moritz Nussbaum. - *Ueber den Bau und die Thätigkheit der Drüsen IV Mittheilung.* - Archives de Schultze, 1882, t. XXI, pag. 296.

M. Ogata. - *Die Veränderungen der Pankreaszellen bei der Sekretion.* - Arch. für Anat. und Physiologie. Phys. Abtheilung, 1883, pag. 405.

C. I. Eberth und Kurt Müller. - *Untersuchungen über das Pankreas.* - Zeitschrift für wissenschaftliche zoologie 1892. - Bd. 53, suppl. pag. 112-135.

G. Platner. - *Ueber die Entstehung des Nebenkerns und seine Beziehung zur Kerntheilung.* - Archives de Schultze, 1886, T. XXVI.

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE

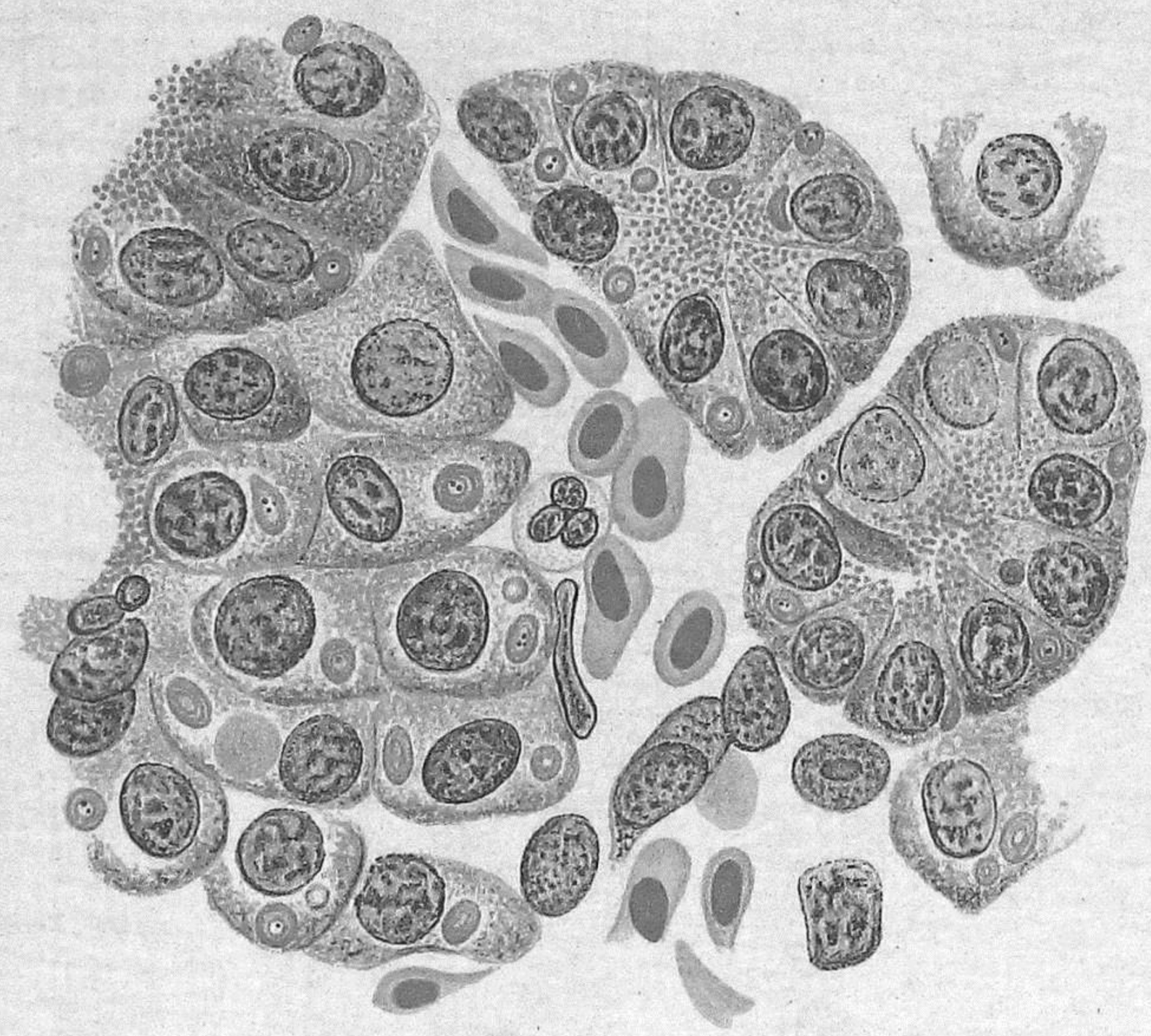
Fig. I. — Sezione di pancreas di tritone. Fissazione con liquido di Flemming: colorazione con soluzione acquosa satura di rosso magenta.

Microscopio Reichert: ocul. 2, obbiettivo 8.

Fig. II. — Sezione di fegato umano affetto da degenerazione amiloide. Fissazione in alcool: colorazione con soluzione acquosa 1 per cento di rosso magenta.

Microscopio Reichert: ocul. 2, obbiettivo 4.

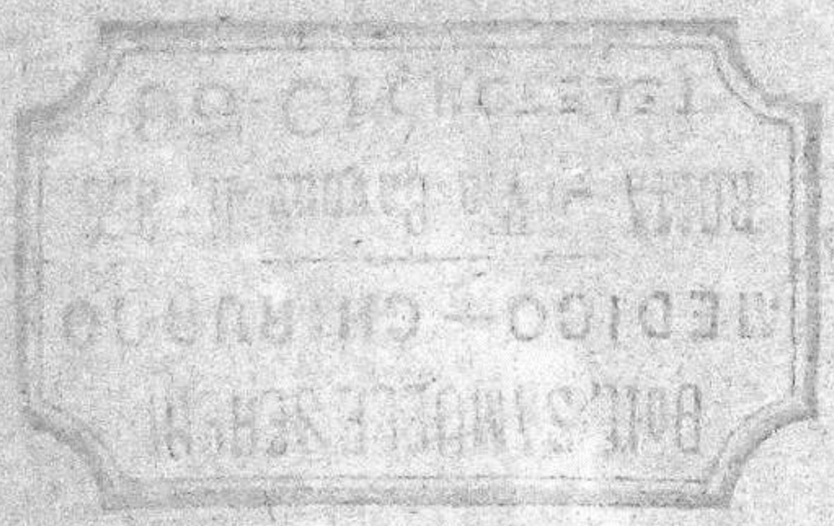
1.



2.

E. Battisti lit. Roma.

Monti dis.



Dott. [illegible]
MEDICO - CHIRURGO
ROMA - Via Cavour N. [illegible]
TELEFONO [illegible]